

EFFECTS OF THE ENZYMATIC INHIBITOR OF KUNITZ  
ON THE GASTRIC LESIONS FROM RESERPINE, FROM  
PHENYLBUTAZONE, FROM PYLORIC LIGATION AND BY  
RESTRAINT IN THE RAT.

By F. Guerrin, A. Demaille, P. Merveille, and

C. Bel

Translation of "Effets de l'inhibiteur enzymatique  
de Kunitz sur les lésions gastriques par reserpine,  
par phenylbutazone, par ligature du pylore et par  
contrainte chez le Rat, Compt Rend Seances Soc.  
Biol. Paris, Vol. 159, No. 5, 1965, pp. 1172-1174.

(NASA-TM-76027) EFFECT OF THE ENZYMATIC  
INHIBITOR OF KUNITZ ON THE GASTRIC LESIONS  
FROM RESERPINE, FROM PHENYLBUTAZONE, FROM  
PYLORIC LIGATION AND BY RESTRAINT IN THE RAT  
(National Aeronautics and Space

N80-18681

HC A02/MF A01

Unclass

63/51 47200

NATIONAL AERONAUTICS AND SPACE ADMINISTRATION  
WASHINGTON, D.C. 20546 FEBRUARY, 1980

## STANDARD TITLE PAGE

1. Report No. NASA TM-76027	2. Government Accession No.	3. Recipient's Catalog No.	
4. Title and Subtitle Effects of the Enzymatic Inhibitor of Kunitz on the Gastric Lesions from Reserpine, from Phenylbutazone, from Pyloric Ligation and by Restraint in the Rat.		5. Report Date February 1980	
		6. Performing Organization Code	
7. Author(s) F. Guerrin, A. Demaille, P. Merveille, C. Bel		8. Performing Organization Report No.	
		10. Work Unit No.	
9. Performing Organization Name and Address SCITRAN Box 5456 Santa Barbara, CA 93108		11. Contract or Grant No. NASw- 3198	
		13. Type of Report and Period Covered Translation	
12. Sponsoring Agency Name and Address National Aeronautics and Space Administration Washington, D.C. 20546		14. Sponsoring Agency Code	
15. Supplementary Notes Translation of "Effets de l'inhibiteur enzymatique de Kunitz sur les lesions gastriques par reserpine, par phenylbutazone, par ligature du pylore et par contrainte chez le Rat, Compt Rend Seances Soc. Biol. Paris, Vol. 159, No. 5, 1965, pp 1172-1174.			
16. Abstract After studying the protective effects of a polypeptide concerning the gastric ulcerations from reserpine and phenylbutazone in the rat, this article concludes that the Kunitz enzymatic inhibitor exerts a protective action in regard to gastric lesions. It does not change the development of Shay ulcers and stress ulcers from restraint.			
17. Key Words (Selected by Author(s)) .. . . .		18. Distribution Statement  Unclassified - Unlimited	
19. Security Classif. (of this report) Unclassified	20. Security Classif. (of this page) Unclassified	21. No. of Pages 6	22. Price

We reported the protective effects of Frey and Werle's in-/1172\* inhibitor, a polypeptide of parotid origin, concerning the gastric ulcerations from reserpine [1] and from phenylbutazone [2] in the rat. We have studied whether Kunitz and Northrop's inhibitor, a polypeptide of pancreatic origin, possesses the same properties and have extended this study to other ulcerogenic procedures: pyloric ligation by the Shay technique [3], and restraint according to Bonfils and Lambling [4]. This enzymatic inhibitor is simultaneously an antitrypsin, an anti-chymotrypsin and an anti-plasmin or anti-fibrinolysin.

Technique - Kunitz inhibitor is administered on 3 consecutive days by the intraperitoneal route at a dose of 25,000 to 50,000 U/kg in rats of the Wistar breed. The last injection is given in the half hour following the ulcerogenic action except for restraint where it is given immediately before.

The details of these different experimental protocols are given in the cited references.

A histological study of the stomach by systematic serial sections was performed on several animals of each lot, in a manner so as to ensure the reality of the apparently complete protection seen on macroscopic examination, and to define the characteristics of the lesions occurring with the enzymatic inhibitor in case of only partial or non-existent protection.

Results. RESERPINE.- In a lot of 15 male rats with anti-enzyme, no gastric lesions were detected in 10 animals, in the other 5 the lesions were less numerous, less extensive than in /1173 our control series, and the mucosa even when there were ulcerations and ulcers present, did not have the shrunken appearance which is often seen after reserpine in these doses. In contrast in 12 females given Kunitz inhibitor, no difference was detected in the incidence of lesions from the controls, outside of less mucosal congestion.

\*Numbers in margins indicate foreign pagination.

PHENYLBUTAZONE - In 47 rats given Kunitz inhibitor, among 37 males there were no gastric lesions in 10 cases, and the lesions were less extensive and less numerous in the other 25 cases than among the controls. In only two instances could no difference be detected.

In 10 females, who are usually more sensitive than males to the effects of phenylbutazone, an absence of lesions was observed only one time, but in 8 females the incidence of lesions was clearly less common than in controls of the same sex. These results are in favor of a protective effect of the Kunitz inhibitor in respect to gastric lesions from phenylbutazone. They demonstrate furthermore that the procedure employed provokes significant gastric lesions in the 77 control rats (26 males and 51 females). This protection is comparable to that exerted by the Frey inhibitor as the table shows, in which the averages of the large ulcerations (more than 3 mm in diameter) and of the small ulcerations (from 1 to 3 mm in diameter) are compared for 3 lots of male rats: that of the controls subjected only to phenylbutazone and those of the animals previously treated with the Frey inhibitor or with the Kunitz inhibitor. The anti-enzyme divides the incidence of large ulcerations by a factor of 8 to 12 and that of the small ones by 3 to 4.

TECHNIQUE	NUMBER OF MALE RATS IN THE SERIES	AVERAGE LARGE ULCERATIONS PER ANIMAL	AVERAGE SMALL ULCERATIONS PER ANIMAL
Phenylbutazone 125 mg/kg intraperitoneally	22	2.5	8.1
Phenylbutazone and Frey inhibitor	21	0.3	2.5
Phenylbutazone and Kunitz inhibitor	37	0.2	1.7

SHAY ULCER - Comparison of a series of 22 controls with that of 20 rats (14 females and 6 males) treated with the Kunitz inhibitor before pyloric ligation did not show any detectable difference which could be attributed to the anti-enzyme.

RESTRAINT ULCER - In a series of 13 controls and 21 rats (with no sex distinction) submitted to enzyme inhibitor, no difference could be found.

DISCUSSION - The Kunitz inhibitor like the Frey inhibitor 1174 more or less completely protects the rat's stomach against the effects of phenylbutazone or of reserpine. The females which are more sensitive than the males to these pharmacodynamic agents in our experimental series, are also less well protected especially in regard to reserpine.

When the protection is incomplete or absent, no histological criterion allows us to surmise that the mechanism of the lesions differs between the control series and the series treated with the anti-enzyme. The necrotic ulcerations have the same appearance only their number and extensiveness differ: with reserpine for example, there were true ulcers of the gastric glandular epithelium and of the pavement epithelium of the rumen.

Whether of parotid or pancreatic origin, the anti-enzyme protects in a similar manner in regard to phenylbutazone even though not avoiding lesions in all the animals, it appears less active than the Frey inhibitor in regard to reserpine especially among females.

The ulcers from restraint or from pyloric ligation imply a different ulcerogenic process from that of the ulcers from pharmacodynamic agents: the apparently total lack of effect in their case allows suspicion that the inhibition is established by the lack of gastric peripheral action from substances such as phenylbutazone.

The respective roles of the anti-trypsin effect and the anti-fibrinolytic effect of these anti-enzymes in the prevention of lesions can be measured by comparison with the effects of - aminocaproic acid which is particularly anti-fibrinolytic and which protects, as we have observed [5], only very poorly the rat's stomach against phenylbutazone and not at all against reserpine.

The described effect of the Frey and Kunitz inhibitors is thus due perhaps to their anti-trypsin qualities but without doubt very little to their anti-fibronolytic properties.

CONCLUSION. The Kunitz enzymatic inhibitor exerts on the rat a protective action in regard to gastric lesions from phenylbutazone or from reserpine, but it protects less completely against the latter than does Frey inhibitor. It does not change the development of Shay ulcers and stress ulcers from restraint. Its anti-trypsin power seems especially likely to take part in the explanation of the experimental results.

#### References

1. F. Guerrin, A. Clay, A. Demaille, R. Druart, and L. Adeais, C.C.R. Soc. Biol., 1963, Vol. 157, p. 121.
2. F. Guerrin, A. Clay, C. L'Hermine, A. Demaille, and R. Druart C.R. Soc. Biol, 1964, vol. 158, p. 1626.
3. F. Guerrin, A. Clay, A. Demaille, C. L'Hermine, and R. Druart, C.R. Biol., 1964, vol. 158, p. 571.
4. S. Bonfils, G. Liefvooghe, G. Rossi and A. Lambling, Arch. Mal. App. Dig., 1959, vol. 48, p. 449.
5. F. Guerrin, Path. and Biol., 1965, vol 13, p. 311.

Pathologie expérimentale.Effets de l'inhibiteur enzymatique de Kunitz  
sur les lésions gastriques par réserpine, par phénylbutazone,  
par ligature du pylore et par contrainte chez le Rat.

par F. GUERIN, A. DEMAILLE, P. L'HERMINE et G. BUI.

Nous avons rapporté les effets protecteurs de l'inhibiteur de Frey et Weile, polypeptide d'origine pancréatique, vis-à-vis des ulcérations gastriques par la réserpine (1\*) et par la phénylbutazone (2\*) chez le Rat. Nous avons recherché si l'inhibiteur de Kunitz et Northrop, polypeptide d'origine pancréatique, possède les mêmes propriétés et avons étendu cette étude à d'autres procédés ulcérogènes : ligature du pylore selon la technique de Shay (3\*), contrainte selon Bonfils et Lambing (4\*). Cet inhibiteur enzymatique est à la fois un anti-trypsin, un anti-chymotrypsine et un anti-plasmine ou anti-fibrinolyse.

**Technique.** — L'inhibiteur de Kunitz est administré 3 jours de suite par voie intrapéritonéale à raison de 25000 ou 50000 U/kg chez le Rat de race Wistar. La dernière injection est faite dans la demi-heure qui suit l'action ulcérogène sauf pour la contrainte où elle est faite aussitôt avant.

La réserpine est injectée par voie sous-cutanée à raison d'une dose unique de 5 mg/kg, la phénylbutazone par voie intrapéritonéale à raison de 125 mg/kg. Pour l'ulcère de Shay le sacrifice de l'animal est fait 24 heures après ligature pylorique. Les contraintes sont réalisées en suspendant horizontalement les rats dans des corsets de grillage et en prenant la précaution de les isoler les uns des autres afin qu'ils ne se voient pas.

Le détail de ces différents protocoles expérimentaux est donné dans les références citées.

Une étude histologique de l'estomac par coupes séries systématiques a été faite pour plusieurs animaux de chaque lot, de façon à évaluer de la réalité des protections apparemment complètes à l'examen microscopique, et à préciser les caractéristiques des lésions sous inhibiteur enzymatique en cas de protection partielle ou inexistante.

**Résultats.** — **Réserpine.** — Pour un lot de 15 rats mâles avec anti-enzyme, aucune lésion gastrique n'a été décelée chez 10 animaux, chez les 5 autres les lésions étaient moins nombreuses, moins étendues que

(1\*) F. Guérin, A. Clay, A. Demaille, B. Druart et L. Adenis, *C. R. Soc. Biol.*, 1963, t. 157, p. 121.

(2\*) F. Guérin, A. Clay, C. L'Hermine, A. Demaille et B. Druart, *C. R. Soc. Biol.*, 1964, t. 158, p. 1626.

(3\*) F. Guérin, A. Clay, A. Demaille, C. L'Hermine et B. Druart, *C. R. Soc. Biol.*, 1964, t. 158, p. 571.

(4\*) S. Bonfils, G. Lafougère, G. Rossi et A. Lambing, *Arch. Mal. App. Dig.*, 1959, t. 48, p. 449.

ORIGINAL PAGE IS  
OF POOR QUALITY

pour nos séries témoins et la muqueuse, même si elle présentait des ulcérations ou des ulcères n'avait pas l'aspect ulcéreux qui est souvent observé après tétracycline à ces doses. Par contre, chez 12 femelles, avec inhibiteur de Kunitz il n'a pas été décelé de différence par rapport à l'incidence lésionnelle chez les témoins, en dehors d'une moindre congestion muqueuse.

**PHÉNYLBUTAZONE.** — Chez 47 rats soumis à l'inhibiteur de Kunitz, pour 37 mâles il n'y a eu aucune lésion gastrique dans 10 cas, et les lésions furent moins étendues et moins nombreuses que chez les témoins dans 25 autres cas. Deux fois seulement aucune différence ne put être décelée.

Pour 10 femelles qui sont habituellement plus sensibles que les mâles aux effets de la phénylbutazone, l'absence de lésion n'a été observée qu'une fois, mais chez 8 femelles l'incidence lésionnelle fut nettement plus faible que chez les témoins de même sexe. Ces résultats sont en faveur d'un effet protecteur de l'inhibiteur de Kunitz vis-à-vis des lésions gastriques par la phénylbutazone. Ils sont d'autant plus démonstratifs que le produit employé a provoqué d'importantes lésions gastriques chez les 77 rats témoins (26 mâles et 51 femelles). Cette protection est comparable à celle qu'exerce l'inhibiteur de Frey comme le montre le tableau où sont comparées les moyennes des grandes ulcé-

Technique	Nombre de rats mâles par série	Moyenne des grandes ulcérations par animal	Moyenne des petites ulcérations par animal
Phénylbutazone 125 mg/kg intraperitoneal	22	2,5	8,1
Phénylbutazone et inhibiteur de Frey ...	21	0,3	2,5
Phénylbutazone et inhibiteur de Kunitz ...	37	0,2	1,7

ractions (plus de 3 mm de diamètre) et des petites ulcérations (de 1 à 3 mm de diamètre) pour 3 lots de rats mâles : celui des témoins soumis à la seule phénylbutazone et ceux d'animaux traités au préalable par l'inhibiteur de Frey ou par l'inhibiteur de Kunitz. L'anti-enzyme divise par 8 à 12 l'incidence des grandes ulcérations et par 3 à 4 celle des petites.

**ULCÈRE DE SHAY.** — La comparaison d'une série de 22 témoins et celle de 20 rats (11 femelles et 9 mâles) traités par l'inhibiteur de Kunitz avant ligature du pylori n'a pas permis de déceler de différence sensible qui put être imputée à l'anti-enzyme.

**L'ULCÈRE DE GASTRIN.** — Chez le Rat, sans distinction de sexe, pour une série de 13 témoins et de 21 animaux soumis à l'inhibiteur enzymatique, aucune différence ne peut être retenue.



ORIGINAL PAGE IS  
OF POOR QUALITY

*Discussion.* -- L'inhibiteur de Kunitz comme l'inhibiteur de Frey protège plus ou moins complètement l'estomac du Rat contre les effets de la phénylbutazone ou de la réserpine. Les femelles plus sensibles que les mâles à ces agents pharmacodynamiques dans nos séries expérimentales sont aussi moins bien protégées surtout vis-à-vis de la réserpine.

Lorsque la protection est incomplète ou absente aucun critère histologique ne permet de supposer que le mécanisme des lésions diffère dans la série témoin et dans la série traitée par l'anti-enzyme. Les ulcérations peptiques ont la même apparence, seuls le nombre et l'étendue diffèrent. Avec la réserpine par exemple il a été décelé des ulcères vésicaux de l'épithélium glandulaire gastrique et de l'épithélium pavimenteux du duodénum.

Qu'il soit d'origine peptique ou pancréatique l'anti-enzyme protège de façon semblable vis-à-vis de la phénylbutazone tout en n'existant pas les lésions chez tous les animaux, il paraît moins actif que l'inhibiteur de Frey vis-à-vis de la réserpine surtout chez les femelles.

Les ulcères par contrainte ou par ligature pylorique impliquent un processus ulcéreux différent de celui des ulcères par agents pharmacodynamiques. L'inefficacité apparentement totale de l'anti-enzyme à leur endroit laisse supposer que l'inhibition s'établit par la gêne de l'action péptique gastrique de substances comme la phénylbutazone.

La part respective de l'effet anti-trypsique et de l'effet anti-fibrinolytique de ces anti-enzymes dans la prévention des lésions peut être appréciée par comparaison avec les effets de l'acide L-aminocaproïque qui est surtout anti-fibrinolytique et qui ne protège, comme nous l'avons observé (5\*), que très incomplètement l'estomac du Rat contre la phénylbutazone et pas du tout contre la réserpine.

L'effet décrit pour les inhibiteurs de Frey et de Kunitz tient ainsi peut-être à leurs qualités anti-trypsiques mais sans doute peu à leurs propriétés anti-fibrinolytiques.

*Conclusion.* -- L'inhibiteur enzymatique de Kunitz exerce chez le Rat une action protectrice à l'égard des lésions gastriques par phénylbutazone ou par réserpine, il protège moins contre celle dernière que ne le fait l'inhibiteur de Frey. Il ne modifie pas l'évolution des ulcères de Shay et par contrainte. Son pouvoir anti-trypsique semble surtout devoir être retenu dans l'explication des résultats expérimentaux.

*Laboratoire de Pathologie expérimentale, Chaire d'Anatomie Pathologique. Directeur : M. A. Clay, Faculté de Médecine et de Pharmacie, Lille).*

(5\*) F. Guerrin, *Path. et Biol.*, 1965, t. 13, p. 311.